

Rec'd PCT/PTO 08 OCT 2004

PCT/EP 03 / 03667

10/910622 09-04-03  
Mod. C.E. - 1-4-7

MODULARIO  
ICA - 101

REC'D 21 MAY 2003

WIPO

PCT



# Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

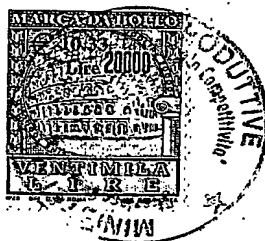
Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

Invenzione Industriale

N.

TQ2002 A 000311



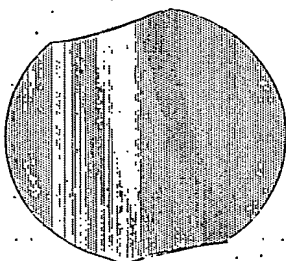
*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

6 NOV. 2002

Roma, li .....



IL DIRIGENTE

*Elena Rivelli*

Sig.ra E. MARINELLI

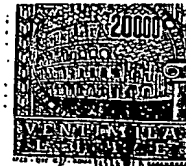
BEST AVAILABLE COPY

# AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A



## A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione MEDESTEA INTERNAZIONALE S.R.L. C.C.I.A.A. SR  
 Residenza TORINO TO codice 0587560000  
 2) Denominazione \_\_\_\_\_  
 Residenza \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.S.M.

cognome e nome CORRADO FIORAVANTI ed altri \_\_\_\_\_ cod. fiscale \_\_\_\_\_  
 (Iscr. No. 553BIV)  
 denominazione studio di appartenenza Jacobacci & Partners S.p.A.  
 via Corso Regio Parco n. 27 città TORINO cap 10152 (prov) TO

## C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via \_\_\_\_\_ n. \_\_\_\_\_ città \_\_\_\_\_ cap \_\_\_\_\_ (prov) \_\_\_\_\_

## D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) \_\_\_\_\_

gruppo/sottogruppo \_\_\_\_\_

PROCEDIMENTO PER LA PREPARAZIONE DI CELLULE STAMINALI DA TESSUTO  
MUSCOLARE E TESSUTO ADIPOSO UMANO E CELLULE STAMINALI OTTENIBILI  
MEDIANTE TALE PROCEDIMENTO

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA \_\_\_\_\_ N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_

## E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) ALESSANDRI GIULIO 3) FRANZONE JOSE' SEBASTIAN  
 2) CARUSO ARNALDO 4) \_\_\_\_\_

## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato S/R

## SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

1) \_\_\_\_\_  
 2) \_\_\_\_\_

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

LETTERA DI INCARICO SEGUE



## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 1 PROV n. pag. 24 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) \_\_\_\_\_  
 Doc. 2) 0 PROV n. tav. 00 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) \_\_\_\_\_  
 Doc. 3) 1 RIS dichiarazione sostitutiva di certificazione \_\_\_\_\_  
 Doc. 4) 0 RIS lettera e incarico, procura e affidamento procura generale \_\_\_\_\_  
 Doc. 5) 0 RIS designazione inventore \_\_\_\_\_  
 Doc. 6) 0 RIS documenti di priorità con traduzione in italiano \_\_\_\_\_  
 Doc. 7) 0 RIS autorizzazione o atto di cessione \_\_\_\_\_  
 nominativo completo del richiedente \_\_\_\_\_

## SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

confronta singole priorità

8) attestati di versamento, totale lire

DUECENTONOVANTUNO/80

COMPILATO IL 10/04/2002

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

CORRADO FIORAVANTI

obbligatorio

CONTINUA SINO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SINO SI

Jacobacci & Partners S.p.A.

C.C.I.A.A. DI TORINO

2002 A 000311

codice 01

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

Reg. A

L'anno duemiladue

duemiladue

il giorno

Dieci

del mese di

Aprile

Il (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

## I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE

SINO ORLANDO

Umberto  
Torino

L'UFFICIALE ROGANTE

Silvana BUSO

NUMERO DOMANDA

10 2002 00031 1

REG. A

NUMERO BREVETTO

DATA DI DEPOSITO

10/04/2002

DATA DI RILASCIO

/ /

## A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

MEDESTEA INTERNAZIONALE S.R.L.

Residenza

TORINO

TO

## D. TITOLO

PROCEDIMENTO PER LA PREPARAZIONE DI CELLULE STAMINALI DA TESSUTO  
MUSCOLARE E TESSUTO ADIPOSO UMANO E CELLULE STAMINALI OTTENIBILI  
MEDIANTE TALE PROCEDIMENTO

Classe proposta (sez./cl./scl/)

/ / /

(gruppo/sottogruppo)

/ / /

## L. RIASSUNTO

L'invenzione si riferisce ad un procedimento per la preparazione di cellule staminali umane a partire da tessuto muscolare o tessuto adiposo. Il procedimento prevede l'incubazione di cellule ottenute da un campione di tessuto muscolare o adiposo in un terreno comprendente BSA, bFGF, EGF, VEGF, LIF, eparina e usuali sali inorganici, amminoacidi naturali e vitamine necessari per la crescita di cellule di mammifero. L'invenzione riguarda anche le cellule staminali umane del muscolo (hMSC) e del tessuto adiposo (hFSC) ottenibili mediante tale procedimento.

## M. DISEGNO



Descrizione dell'invenzione industriale dal  
titolo: "Procedimento per la preparazione di  
cellule staminali da tessuto muscolare e tessuto  
adiposo umano e cellule staminali ottenibili  
mediante tale procedimento".

Di: Medestea Internazionale S.r.l., nazionalità  
italiana, Via Magenta 43, 10128 TORINO.

Inventori designati: ALESSANDRI, Giulio; CARUSO,  
Arnaldo; FRANZONE, José Sebastian.

Depositata il: 10 aprile 2002

\* \* \* 10 2002 A 00031 11

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda un procedimento  
per la preparazione di cellule staminali umane a  
partire da un campione di tessuto adiposo o  
muscolare umano, nonché cellule staminali umane  
ottenibili mediante tale procedimento.

In particolare, l'invenzione riguarda la  
preparazione di cellule staminali umane del  
muscolo (hMSC) e del tessuto adiposo (hFSC) a  
partire da un campione rispettivamente di tessuto  
muscolare scheletrico e di tessuto adiposo.

E' noto che il muscolo scheletrico possiede una  
capacità rigenerativa grazie alla presenza di  
cellule immature progenitrici muscolari. Ogni

JACOBACCI & PARTNERS SpA.

fibra muscolare contiene infatti cellule capaci di crescere e differenziarsi in fibre muscolari; tali cellule vengono chiamate cellule satelliti. Le cellule satelliti sono generalmente quiescenti e si mantengono sotto forma indifferenziata sotto la lamina basale della fibra muscolare. Una lesione del muscolo determina un'attivazione di queste cellule portandole dalla fase quiescente alla fase di crescita. Alcune di queste cellule si differenziano in miociti che fondendo gli uni con gli altri portano alla rigenerazione di una nuova fibra muscolare, ripristinando quindi la normale funzione muscolare. Un'altra parte delle cellule satelliti rimane in una forma indifferenziata riportando il numero di cellule satelliti nella fibra muscolare alla quantità originaria.

I presenti inventori hanno ora messo a punto un procedimento che consente di ottenere, a partire da un campione di tessuto muscolare umano, cellule staminali ancor più indifferenziate delle cellule satelliti, in quanto in grado di differenziarsi sia in cellule satelliti ma anche in elementi cellulari diversi quali cellule nervose (neuroni, gliociti, astrociti), vascolari (endotelio) e dell'osso (osteoblasti).

I presenti inventori hanno inoltre utilizzato lo stesso procedimento di preparazione su campioni di tessuto adiposo e ciò ha consentito loro di ottenere cellule staminali del tessuto adiposo parimenti in grado di differenziarsi sia in cellule muscolari (lisce e striate) sia in cellule nervose (neuroni, gliociti, astrociti), vascolari (endotelio) e dell'osso (osteoblasti).

Un primo oggetto della presente invenzione è quindi un procedimento per la preparazione di cellule staminali umane a partire da un campione di tessuto adiposo o muscolare umano, comprendente le fasi di:

- a) preparare una sospensione cellulare a partire da un campione di tessuto adiposo o muscolare umano;
- b) recuperare le cellule da detta sospensione cellulare; e
- c) incubare dette cellule in un terreno comprendente BSA, bFGF, EGF, VEGF, LIF, eparina e usuali sali inorganici, amminoacidi naturali e vitamine necessari per la crescita di cellule di mammifero.

Il terreno utilizzato per l'incubazione delle cellule è preferibilmente il terreno DMEM/F12

additivato con: da 0,4% a 0,8% di BSA, bFGF da 5 a 20 ng/ml, EGF da 10 a 40 ng/ml, VEGF da 2,5 a 10 ng/ml, LIF da 5 a 20 ng/ml, eparina da 1 a 20 µg/ml, glucosio da 1,8 a 3 mg/ml, NaHCO<sub>3</sub> da 2 a 2,5 mg/ml, Hepes da  $2,5 \times 10^{-3}$  a  $7,5 \times 10^{-3}$  M, apotrasferrina da 50 a 200 µg/ml, insulina da 10 a 30 µg/ml, putrescina da  $3 \times 10^{-4}$  a  $7 \times 10^{-4}$  M, selenio da  $4 \times 10^{-8}$  a  $8 \times 10^{-8}$  M, progesterone da  $1 \times 10^{-8}$  a  $3 \times 10^{-8}$  M.

La facile accessibilità dei campioni di muscolo e di tessuto adiposo, rende questi tessuti una sorgente ideale per l'isolamento e la crescita di cellule staminali.

Un altro oggetto della presente invenzione è una cellula staminale umana del muscolo (hMSC) ottenibile mediante il procedimento sopra descritto in cui come tessuto di partenza viene utilizzato un campione di tessuto muscolare scheletrico umano.

Ancora un altro oggetto della presente invenzione è una cellula staminale umana del tessuto adiposo (hFSC) ottenibile mediante il procedimento sopra descritto in cui come tessuto di partenza viene utilizzato un campione di tessuto adiposo umano.

JACOBBACCI & PARTNERS SpA



Per l'ottenimento di cellule hMSC, la fase a) del procedimento secondo l'invenzione comprende preferibilmente la digestione del campione di tessuto muscolare scheletrico umano con tripsina.

Inoltre, secondo una forma di attuazione preferita per l'ottenimento di cellule hMSC, la fase c) di incubazione comprende:

c<sub>1</sub>) risospendere le cellule recuperate dalla sospensione cellulare della fase a) nel terreno di crescita definito in precedenza;

c<sub>2</sub>) incubare la sospensione cellulare ottenuta nella fase precedente all'interno di un contenitore per colture cellulari preventivamente trattato con collagene tipo I, per 18 a 24 ore ad una temperatura di circa 37°C e in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>;

c<sub>3</sub>) rimuovere il terreno di crescita da detto contenitore e sostituirlo con ugual terreno di crescita preparato di fresco; e

c<sub>4</sub>) incubare per ulteriori 48 a 72 ore, ottenendo in tal modo la formazione di piccole cellule tondeggianti adese alle pareti di detto contenitore, dette piccole cellule tondeggianti adese essendo cellule staminali umane del muscolo (hMSC).



In alternativa, secondo una forma di attuazione preferita per l'ottenimento di cellule hFSC, la fase c) di incubazione comprende:

c<sub>1</sub>) risospendere le cellule recuperate dalla sospensione cellulare della fase a) nel terreno di crescita definito in precedenza;

c<sub>2</sub>) incubare la sospensione cellulare ottenuta nella fase precedente all'interno di un contenitore per colture cellulari preventivamente trattato con collagene tipo I, per 18 a 24 ore ad una temperatura di circa 37°C e in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>;

c<sub>3</sub>) recuperare le cellule non adese alle pareti di detto contenitore e risospenderle nel terreno di crescita definito in precedenza preparato di fresco;

c<sub>4</sub>) porre la sospensione cellulare ottenuta nella fase precedente in un secondo contenitore per colture cellulari non preventivamente trattato con collagene ed ivi coltivarvi le cellule per 7 a 10 giorni, ottenendo in tal modo la formazione di aggregati cellulari galleggianti, le cellule di detti aggregati essendo cellule staminali umane del tessuto adiposo (hFSC).

In questa forma di attuazione le fasi c<sub>2</sub>) e c<sub>3</sub>) vengono preferibilmente ripetute altre 2 volte - per un totale di 3 cambi di terreno - prima di procedere alla successiva fase c<sub>4</sub>) di incubazione nel contenitore non trattato con collagene.

Grazie alla loro capacità di differenziarsi in una molteplicità di tipi cellulari diversi, le cellule staminali hMSC ed hFSC della presente invenzione possono essere utilizzate in una varietà di applicazioni terapeutiche quali:

- la terapia di tessuti ischemici a seguito di fenomeni trombotici o traumatici oppure la riparazione di danni vascolari dovuti a fenomeni traumatici o di origine aterosclerotica (per tali applicazioni le cellule staminali possono essere ingegnerizzate con l'introduzione nel loro genoma di fattori angiogenici come ad esempio il VEGF ("vascular endothelial growth factor"));
- la rigenerazione di tessuti muscolari striati;
- la rigenerazione di tessuti muscolari scheletrici a causa di eventi traumatici;
- la terapia cellulare nell'infarto del miocardio;
- la rigenerazione di tessuto osseo e cartilagineo;



JACOBACCI & PARTNERS SPA

- nel co-trapianto con altre cellule staminali, quali ad esempio midollari o neuronali, per supportare l'attecchimento e la crescita e favorire la rigenerazione di tessuti mesenchimali (osso, cartilagine, muscolo liscio e vascolare);
- nell'attecchimento di tessuto osseo innestato ed in generale in tutte le condizioni che richiedono l'attecchimento e la crescita di cellule e tessuti nell'organismo umano;
- la produzione di fattori di crescita e/o trofici per cellule di diversa origine e provenienza;
- la produzione di ormoni a scopo terapeutico nell'uomo;
- la bioingegneria tissutale;
- la rigenerazione di nervi periferici;
- il trattamento della sclerosi multipla;
- la rigenerazione del tessuto nervoso centrale;
- il trattamento della malattia di Parkinson e del morbo di Alzheimer.

#### Isolamento di hMSC

Un campione biotico di muscolo scheletrico umano, dopo essere stato pesato ed opportunamente catalogato e registrato, viene trasferito in una Petri da coltura e finemente frammentato con un bisturi in frammenti di circa  $1 \text{ mm}^3$  o inferiori.

Dopo l'aggiunta di PBS (tampone fosfato isotonic) ed antibiotici i frammenti vengono trasferiti in una provetta conica e lavati 3 volte con PBS mediante leggera centrifugazione a 200 rpm a 4°C. Terminato l'ultimo lavaggio e scartato il supernatante, ai frammenti si aggiunge una soluzione di tripsina 0,25% (peso/volume) e 0,25% EDTA (acido etilendiamminotetracetico). La quantità di volume di tripsina da aggiungere viene calcolata rispetto al volume di tessuto frammentato: per circa 0,5 ml di tessuto si aggiungono circa 3 ml di soluzione enzimatica. La provetta è poi trasferita in un bagno termostato a 37°C ed incubata per circa 2 ore sotto leggera agitazione.

Terminata l'incubazione dei frammenti con tripsina, la provetta è lasciata per circa 10 minuti a temperatura ambiente a risposare, in maniera da far depositare tutto il materiale non digerito sul fondo della provetta. Le cellule in sospensione vengono aspirate con una pipetta Pasteur e trasferite in una nuova provetta contenente pari volume di terreno DMEM addizionato con 10% di FCS (siero fetale di vitello) che serve per bloccare l'azione della tripsina. Le cellule

vengono quindi recuperate mediante centrifugazione a 1000 rpm per 10 minuti. Il pellet ottenuto viene successivamente lavato 3 volte con PBS mediante centrifugazione per rimuovere tutto l'FCS. Infine il pellet cellulare ottenuto viene risospeso in un terreno di crescita per cellule staminali denominato HUMAN-G composto da terreno DMEM/F12 (Gibco) contenente: 0,8% di BSA (sieroalbumina bovina), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) 10 ng/ml, EGF (Epidermal Growth Factor) 20 ng/ml, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) 5 ng/ml, LIF (Lymphocyte Inhibitor Factor) 10 ng/ml, eparina 10 µg/ml, glucosio 2,4 mg/ml, NaHCO<sub>3</sub> 2,25 mg/ml, Hepes 5x10<sup>-3</sup> M, apotrasferrina 100 µg/ml, insulina 25 µg/ml, putrescina 6x10<sup>-4</sup> M, selenio 6x10<sup>-8</sup> M, progesterone 2x10<sup>-8</sup> M.

Le cellule vengono quindi seminate in una fiasca da coltura T 25 preventivamente trattata con collagene tipo I per favorire l'adesione cellulare. La fiasca è poi incubata per 18-24 ore in un incubatore a 37°C con 5% di CO<sub>2</sub>. Alla fine dell'incubazione il terreno viene rimosso e sostituito con lo stesso terreno HUMAN-G preparato di fresco; la fiasca viene poi riposta per altre 48-72 ore nell'incubatore.

Le cellule adese nella fiasca da coltura sono inizialmente composte da una popolazione di piccole cellule affusate (ossia le cellule satelliti del muscolo striato), mentre le cellule in sospensione nel terreno sono generalmente globuli rossi o cellule morte e vengono facilmente rimosse mediante aspirazione. Dopo circa 48-72 ore di incubazione, sul fondo della coltura insieme alle cellule satelliti cominciano a comparire piccole cellule tondeggianti, cioè le cellule staminali del muscolo (hMSC).

Queste ultime si originano solo utilizzando il terreno di coltura descritto in precedenza. Infatti, con altri terreni di crescita noti nell'arte queste cellule piccole e tondeggianti non si sviluppano.

Dopo circa 1-2 settimane dalla semina iniziale, oltre alle cellule satelliti affusate e alle cellule piccole e tondeggianti si comincia ad osservare la presenza di cellule in sospensione. Queste cellule non sono in grado di proliferare autonomamente ma comunque il loro numero aumenta col procedere della coltura, suggerendo che derivino dalle cellule piccole e tondeggianti. Esse pertanto non rappresentano un'altra



JACOBIACCI & PARTNERS SpA

popolazione cellulare, ma probabilmente una fase intermedia di differenziazione delle cellule staminali adese. Dopo circa 1 mese di coltura si possono ottenere cellule staminali del muscolo (hMSC) in discreta quantità. In queste condizioni sperimentali le hMSC possono moltiplicarsi in coltura e possono raggiungere una discreta numerosità ( $2-3 \times 10^6$ ) senza mostrare particolari segni di variazione morfologica almeno dopo 3 mesi di coltura. Dopo tale periodo la crescita si riduce e cominciano a comparire cellule con morfologia fortemente allungata caratteristica delle cellule muscolari differenziate. Inoltre, se dalla coltura di hMSC si rimuovono le cellule in sospensione e le si coltiva su proteine della membrana basale come la laminina, queste si possono differenziare in cellule di origine nervosa (astrociti, neuroni) cioè diverse dal tessuto muscolare di origine.

#### Isolamento di hFSC

Un campione di tessuto adiposo viene pesato, trasferito in una piastra da coltura e lavato abbondantemente con PBS. Dopo questa operazione il tessuto adiposo, essendo generalmente molto lasso, non richiede la disagregazione meccanica con

bisturi che è invece necessaria per il tessuto muscolare. Esso viene quindi facilmente disgregato tramite l'azione meccanica di risospensione con una pipetta Pasteur. Il tessuto viene successivamente lavato con PBS e trasferito in una provetta e lasciato riposare a temperatura ambiente per circa 10 minuti. Questa procedura permette a tutto il tessuto grasso che è galleggiante di salire in superficie, mentre la componente connettivale precipita sul fondo della provetta. La componente grassa viene quindi recuperata con una pipetta e trasferita in una nuova provetta contenente una soluzione di collagenasi 0,25%. La quantità di soluzione enzimatica da aggiungere al tessuto adiposo dipende dalla quantità di materiale da processare: per circa 1 ml di grasso si aggiungono circa 2 ml di soluzione enzimatica. Il materiale viene incubato per circa 2 ore a 37°C in leggera agitazione, dopodiché il tessuto digerito viene lavato 2 o 3 volte con PBS mediante centrifugazione a 1000 rpm per 10 minuti. Il pellet cellulare ottenuto viene risospeso in PBS e la sospensione cellulare ottenuta viene filtrata (filtro di porosità 30 µm) per rimuovere tutti i



frammenti vascolari, che sono abbondantemente presenti nel tessuto adiposo e sono spesso di dimensioni superiori a 30  $\mu\text{m}$ . Tutte le cellule o i microaggregati cellulari di dimensioni inferiori a 30  $\mu\text{m}$  vengono recuperati mediante centrifugazione (1000 rpm per 10 minuti), il sovranatante viene scartato e il pellet cellulare viene risospeso nel terreno HUMAN-G come descritto in precedenza in relazione all'ottenimento di hMSC, con l'unica variante che le concentrazioni di LIF e VEGF sono rispettivamente di 20 ng/ml e 10 ng/ml. Le cellule vengono poi seminate in una fiasca T25 collagenata ed incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> per circa 18-24 ore. Le cellule differenziate, i frammenti vascolari e i fibroblasti presenti nella preparazione aderiscono alla fiasca da coltura, mentre tutte le cellule morte ed indifferenziate (cioè staminali) continuano a galleggiare nel terreno. Questa procedura viene generalmente ripetuta 3 volte per avere una buona certezza di aver rimosso tutte le cellule differenziate dalla preparazione. Alla fine dell'ultima rimozione, le cellule non aderenti vengono centrifugate a 500 rpm, risospese in HUMAN-G fresco e seminate in fiasche T 25 non trattate con collagene. Dopo

circa 7-10 giorni dalla iniziale messa in coltura si possono osservare delle formazioni di più cellule aggregate che galleggiano nel terreno di coltura. Queste cellule sono le hFSC. Dopo circa 30-45 giorni di coltura la quantità di cellule staminali raggiunge una discreta numerosità (circa  $2-3 \times 10^6$ ).

#### Caratterizzazione fenotipica e funzionale delle hMSC

E' stata analizzata l'espressione di diversi markers sulle cellule hMSC secondo l'invenzione.

Mediante tecniche di citofluorimetria è stata confermata la positività delle cellule hMSC al CD34 e Bcl-2+, marcatori per i quali le MSC di topo erano risultate positive in studi precedenti. E' stata inoltre confermata la positività al KDR/Flk-1 e al Sca-1, ossia marcatori che si ritrovano anche sulle cellule staminali del midollo osseo.

Tramite studi in immunoistochimica e immunofluorescenza è stata valutata l'espressione di markers muscolari come la desmina e la miogenina.

Per valutare le caratteristiche di differenziamento delle hMSC in cellule di origine

nervosa, i markers fenotipici neuronali sono stati analizzati a vari tempi di coltura. Le cellule sono state coltivate da 7 a 24 giorni su un substrato di laminina in presenza di terreno di coltura senza fattori di crescita. Dopo circa 7-10 giorni, è stata rilevata la presenza di GAD, un marcatore per neuroni GABAergici, che indica il differenziamento in neuroni del sistema nervoso periferico. Inoltre è stata osservata la positività delle hMSC al GFAP, che suggerisce il differenziamento in cellule della glia (gliociti).

Dopo circa 21 giorni è stata analizzata la presenza dei neurofilamenti-M (NFM) che risultata solo limitatamente positiva.

Il differenziamento delle hMSC in cellule muscolari lisce e striate è stato analizzato facendo uso di anticorpi contro la desmina. A questo scopo, le cellule sono state coltivate su substrati di collagene in terreno senza fattori di crescita in presenza di FCS al 3%.

Il differenziamento in cellule dell'osso (osteoblasti) è stato analizzato valutando la presenza di osteocalcina, una proteina che è specificamente prodotta dagli osteoblasti.



JACOBACCI & PARTNERS SPA

Poiché in letteratura è stata riportata l'esistenza di un progenitore comune per le cellule endoteliali e le cellule muscolari dei vasi, la capacità osservata delle hMSC di differenziarsi in cellule del tessuto muscolare consente di prevedere che tali cellule siano anche in grado di differenziarsi in fenotipo endoteliale.

Poiché le hFSC della presente invenzione hanno la stessa origine mesenchimale delle hMSC, possiamo inoltre prevedere che le stesse capacità differenziali sopra descritte contenute nelle hMSC siano presenti anche nelle hFSC.

### RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la preparazione di cellule staminali umane a partire da un campione di tessuto adiposo o muscolare umano, comprendente le fasi di:

a) preparare una sospensione cellulare a partire da un campione di tessuto adiposo o muscolare umano;

b) recuperare le cellule da detta sospensione cellulare; e

c) incubare dette cellule in un terreno comprendente BSA, bFGF, EGF, VEGF, LIF, eparina e usuali sali inorganici, amminoacidi naturali e vitamine necessari per la crescita di cellule di mammifero.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 2, in cui detto terreno è DMEM/F12 additivato con: da 0,4% a 0,8% di BSA, bFGF da 5 a 20 ng/ml, EGF da 10 a 40 ng/ml, VEGF da 2,5 a 10 ng/ml, LIF da 5 a 20 ng/ml, eparina da 1 a 20 µg/ml, glucosio da 1,8 a 3 mg/ml,  $\text{NaHCO}_3$  da 2 a 2,5 mg/ml, Hepes da  $2,5 \times 10^{-3}$  a  $7,5 \times 10^{-3}$  M, apotrasferrina da 50 a 200 µg/ml, insulina da 10 a 30 µg/ml, putrescina da  $3 \times 10^{-4}$  a  $7 \times 10^{-4}$  M, selenio da  $4 \times 10^{-8}$  a  $8 \times 10^{-8}$  M, progesterone da  $1 \times 10^{-8}$  a  $3 \times 10^{-8}$  M.

JACOBBACCI & PARTNERS SpA

3. Procedimento secondo la rivendicazione 1 oppure 2, in cui detto campione di tessuto è un campione di muscolo scheletrico umano e dette cellule staminali sono cellule staminali umane del muscolo (hMSC).

4. Procedimento secondo la rivendicazione 3, in cui detta fase a) comprende la digestione del campione di muscolo scheletrico con tripsina.

5. Procedimento secondo la rivendicazione 3 oppure 4, in cui detta fase c) comprende:

c<sub>1</sub>) risospendere le cellule recuperate dalla sospensione cellulare della fase a) in terreno di crescita come definito nella rivendicazione 1 oppure 2;

c<sub>2</sub>) incubare la sospensione cellulare ottenuta nella fase precedente all'interno di un contenitore per colture cellulari preventivamente trattato con collagene tipo I, per 18 a 24 ore ad una temperatura di circa 37°C e in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>;

c<sub>3</sub>) rimuovere il terreno di crescita da detto contenitore e sostituirlo con ugual terreno di crescita preparato di fresco; e

c<sub>4</sub>) incubare per ulteriori 48 a 72 ore, ottenendo in tal modo la formazione di piccole

cellule tondeggianti adese alle pareti di detto contenitore, dette piccole cellule tondeggianti adese essendo cellule staminali umane del muscolo (hMSC).

6. Cellule staminali umane del muscolo (hMSC) ottenibili mediante un procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 3 a 5.

7. Procedimento secondo la rivendicazione 1 oppure 2, in cui detto campione di tessuto è un campione di tessuto adiposo umano e dette cellule staminali sono cellule staminali umane del tessuto adiposo (hFSC).

8. Procedimento secondo la rivendicazione 7, in cui detta fase c) comprende:

c<sub>1</sub>) risospendere le cellule recuperate dalla sospensione cellulare della fase a) in terreno di crescita come definito nella rivendicazione 1 oppure 2;

c<sub>2</sub>) incubare la sospensione cellulare ottenuta nella fase precedente all'interno di un contenitore per colture cellulari preventivamente trattato con collagene tipo I, per 18 a 24 ore ad una temperatura di circa 37°C e in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>;



JACOACCI & PARTNERS SPA

c<sub>3</sub>) recuperare le cellule non adese alle pareti di detto contenitore e risospenderle in terreno di crescita come definito nella rivendicazione 1 oppure 2 preparato di fresco;

c<sub>4</sub>) porre la sospensione cellulare ottenuta nella fase precedente in un secondo contenitore per colture cellulari non preventivamente trattato con collagene ed ivi coltivarvi le cellule per 7 a 10 giorni, ottenendo in tal modo la formazione di aggregati cellulari galleggianti, le cellule di detti aggregati essendo cellule staminali umane del tessuto adiposo (hFSC).

9. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui le fasi c<sub>2</sub>) e c<sub>3</sub>) sono ripetute per altre 2 volte.

10. Cellule staminali umane del tessuto adiposo (hFSC) ottenibili mediante un procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 7 a 9.

11. Cellule staminali secondo la rivendicazione 6 oppure 10 per l'impiego nella rigenerazione di un tessuto scelto dal gruppo che consiste di tessuto osseo, tessuto cartilagineo, tessuto endoteliale, tessuto muscolare liscio, tessuto muscolare striato e tessuto nervoso.

12. Cellule staminali secondo la rivendicazione 6 oppure 10 per l'impiego nel trattamento di tessuti



ischemici, nella riparazione di danni vascolari, nella terapia cellulare dell'infarto del miocardio, nel co-trapianto con altre cellule staminali o tessuti, nella produzione di fattori di crescita e/o trofici, nella produzione di ormoni, nella bioingegneria tissutale, nella rigenerazione di nervi periferici, nel trattamento della sclerosi multipla, nel trattamento dell'infarto del miocardio, nel trattamento della malattia di Alzheimer o nel trattamento del morbo di Parkinson.

13. Uso di cellule staminali secondo la rivendicazione 6 oppure 10 per la preparazione di un medicamento per la rigenerazione di un tessuto scelto dal gruppo che consiste di tessuto osseo, tessuto cartilagineo, tessuto endoteliale, tessuto muscolare liscio, tessuto muscolare striato e tessuto nervoso.

14. Uso di cellule staminali secondo la rivendicazione 6 oppure 10 per la preparazione di un medicamento per il trattamento di tessuti ischemici, la riparazione di danni vascolari, la terapia cellulare dell'infarto del miocardio, il co-trapianto con altre cellule staminali o tessuti, la rigenerazione di nervi periferici, il

trattamento della sclerosi multipla, il  
trattamento dell'infarto del miocardio, il  
trattamento della malattia di Alzheimer o il  
trattamento del morbo di Parkinson.

*Corrado Fioravante*  
CORRADO FIORAVANTE  
(SED. NO. 538M)  
PER INCARICO



C.C.I.A.A.  
Torino

*RB*

JACOBACCI & PARTNERS SpA

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**